

# Bakteerien merkitys suusyövän etiologiassa – eri tutkimusmenetelmät ja päälöydökset

Anniina Haakana

Hammaslääketieteen kandidaatti

Helsinki

Tutkielma

[anniina.haakana@helsinki.fi](mailto:anniina.haakana@helsinki.fi)

Ohjaajat: Professori, EHL, HLT Tuula Salo

Tutkijatohtori, FT Pirjo Åström

HELSINGIN YLIOPISTO

Lääketieteellinen tiedekunta

Tiedekunta – Fakultet – Faculty <b>Lääketieteellinen tiedekunta</b>		Koulutusohjelma – Utbildningsprogram – Degree Programme <b>Hammaslääketieteen koulutusohjelma</b>	
Tekijä – Författare – Author <b>Anniina Haakana</b>			
Työn nimi – Arbetets titel – Title <b>Bakteerien merkitys suusyövän etiologiassa – eri tutkimusmenetelmät ja päälöydökset</b>			
Oppiaine/Opintosuunta – Läroämne/Studieinriktning – Subject/Study track <b>Hammaslääketiede</b>			
Työn laji – Arbetets art – Level <b>Tutkielma</b>	Aika – Datum – Month and year <b>06/2020</b>	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages <b>31+1</b>	
Tiivistelmä – Referat – Abstract <p>Suusyövän tärkeimmät riskitekijät tunnetaan hyvin ja merkittävä osa suusyövistä olisikin ehkäistävissä ainoastaan elämäntapamuutoksilla. Suuontelossa esiintyvien bakteerien yhteyttä suusyöpään on tutkittu paljon ja tulokset ovat vakuuttavia. Suusyöpäpotilailla korostuvilla bakteerilajeilla on todettu olevan lukuisia ominaisuuksia, mitkä voivat edesauttaa syövän syntyä ja kehitystä. Selvää kausaliteettia bakteerien ja suusyövän välillä ei kuitenkaan olla kyetty määrittämään. Osa syynä tähän on tutkimusmenetelmien erilaisuus, mistä johtuen tutkimustuloksia on vaikea vertailla keskenään. Jos kausaliteetti voitaisiin määrittää, tietoa voisi käyttää hyödyksi suusyövän ehkäisyssä, diagnostiikassa ja hoidossa.</p> <p>Tutkielmassani käyn läpi joukon tutkimuksia, joissa on tutkittu suusyövän ja bakteerien välistä yhteyttä. Käytettyjä tutkimusmenetelmiä ovat ihmiseltä otetut biopsia-, sylki- ja pyyhkäisynäytteet, ihmisen erilaisten solulinjojen viljelmät sekä koe-eläinmalli (hiiri). Yleisesti tutkimuksissa käytettyjä menetelmiä ovat olleet bakteerien perimäaineksen eristäminen, 16S ribosomaalisen RNA:n monistaminen PCR:llä, sekvensointi ja sekvenssien haku erilaisista tietokannoista. Paljon käytettyjä menetelmiä ovat olleet myös immunohistokemialliset- ja värjäysmenetelmät. Tutkimustuloksissa on havaittu mikrobiomin erilaisuus terveiltä verrokeilta ja suusyöpäpotilailta otettujen näytteiden välillä. Suusyöpäpotilaiden näytteissä ovat korostuneet esimerkiksi <i>Fusobacterium</i>-, <i>Pseudomonas</i>-, <i>Campylobacter</i>- ja <i>Prevotella</i>-lajit. Soluviljelmissä ja koe-eläinmallissa on havaittu <i>Porphyromonas gingivalis</i>- ja <i>Fusobacterium nucleatum</i>-infektion kiihdyttävän syövän kehitystä. (176 sanaa)</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords <b>Levyepiteelikarsinooma; Suun kasvaimet; Mikrobisto; Bakteerit; Tutkimusmenetelmät</b>			
Ohjaaja tai ohjaajat – Handledare – Supervisor or supervisors <b>Professori, EHL, HLT Tuula Salo, Tutkijatohtori, FT Pirjo Åström</b>			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited <b>Tiedekunnan kanslia toimittaa Terkkoon. Opiskelija tallettaa sähköisen version Heldaan.</b>			

## Sisällysluettelo

1 Johdanto .....	1
2 Suusyövän etiologia.....	2
3 Tutkimusmenetelmät.....	5
3.1 Näytteenotto ja näytteenvalmistus.....	5
3.2 Näytteen eristys ja tutkiminen.....	6
4 Tutkimukset.....	8
4.1 Ihmisenäytteet .....	8
4.2 Soluviljelmänäytteet.....	16
4.3 Koe-eläinnäytteet.....	22
5 Yhteenveto tutkimusten menetelmistä, päälöydöksistä ja tutkituista bakteereista .....	23
6 Pohdinta.....	27
Lähdeluettelo .....	30

# 1 Johdanto

Suusyövän ilmentyvyys Suomessa on kasvanut (1). Suusyövistä 90 % on suun levyepiteelikarsinoomia (*oral squamous cell carcinoma*, OSCC) (1). Suusyöpä esiintyy useimmiten suunpohjassa, kielessä tai ikenissä (1). Vaikka suuontelo on helposti tutkittavissa, suusyöpä huomataan usein myöhään (2). Diagnoosin saantia hankaloittaa suusyövän vähäoireisuus tai oireettomuus, jolloin hoitoon hakeutuminen viivästyy (1). Suusyövän ensioire on usein suussa oleva haava tai rupi, mikä ei parane muutamassa viikossa (1).

Suusyöpä on nopeasti etenevä tauti. Se lähettää varhain etäpesäkkeitä kaulan imusolmukkeisiin ja myöhemmin keuhkoihin, maksaan ja luihin. Edistyneestä kirurgiasta, sädehoidosta ja kemoterapiasta huolimatta, suusyövän viiden vuoden eloonjäämisennuste on heikko. Eloojäämisennuste Suomessa miehille on 67 % ja naisille 61 %. Vaikka potilas selviäisikin ja olisi viiden vuoden kuluttua diagnoosista hengissä, taudin uusimisriski on suuri. Suusyöpäpotilaan riski syövän uusiutumiseen tai uuden syövän kehittymiseen on noin 30-43 %. (1)

Jo yli kaksikymmentä vuotta sitten osoitettiin, että huono suuhygienia, hampaiden menetys ja OSCC liittyivät toisiinsa (3). Ihmisen suun mikrobiomiin kuuluu ainakin 687 eri lajia (2). Suuontelon normaalifloora voi järkkäytyä esimerkiksi huonon suuhygienian tai epäedullisten elämäntapamuutosten vuoksi, jolloin sairautta aiheuttavien bakteerien määrä voi kasvaa (2). Yleisimmät suun infektiosairaudet ovat karies ja parodontiitti. Kariessä esiintyviä bakteereja ovat *Mutans streptococci*, *Mutans lactobacilli* ja *Bifidobacteria* kun taas parodontiitissa korostuneina ovat muun muassa *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* ja *Treponema denticola* (2).

Suusyöpää on tutkittu paljon. Lukuisista tutkimuksista ja niiden vakuuttavista tuloksista huolimatta, suun muuntuneen mikrobiomin ja suusyövän selvää syy-seuraussuhdetta ei olla pystytty todistamaan (5). Osa syynä tähän on sopivan eläinmallin puute (9). Jos selvä syy-seuraussuhde pystyttäisiin määrittämään, tietoa voitaisiin käyttää apuna syövän diagnostiikan, hoidon sekä tukihoitomuotojen kehittämisessä (5). Muuntuneen mikrobiomin havaitseminen voisi auttaa tunnistamaan ne potilaat, joilla suurentunut riski sairastua suusyöpään. Näin riskipotilaita voitaisiin seurata paremmin ja mahdolliset syöpähoidot kyettäisiin aloittamaan aiemmin. Mitä varhaisemmassa vaiheessa OSCC huomataan, sitä paremmat mahdollisuudet potilaalla on selvitä (1).

## 2 Suusyövän etiologia

Noin 75 % suusyövistä olisi estettävissä (1). Suusyövän tärkeimmät riskitekijät ovat tupakointi ja alkoholin käyttö. Tupakan ja alkoholin yhtäaikainen käyttö nostaa vaaran moninkertaiseksi (1). Nuuskaamisen merkityksestä itsenäisenä riskitekijänä on ristiriitaista tietoa (1). Nuuskaaminen aiheuttaa limakalvolle käyttökohtaan limakalvomuutoksen, joka paranee mikäli nuuskan käyttö lopetetaan. Maailmanlaajuisesti nuuskaaminen ilmeisesti lisää suusyövän riskiä, riskin suuruutta ja olemassaoloa on kuitenkin vaikea osoittaa tutkimuksin.

Myös suun krooninen hiivasieni-infektio näyttäisivät nostavan suusyöpäriskiä (1). Suun alueen HPV-tartunta (*Human Papilloma Virus*) nostaa suusyövän riskiä, mutta riskin suuruutta ei tiedetä (1). Aasiassa suurena riskitekijänä ovat myös purutupakka ja betel-pähkinä (6).

Suussa voi lisäksi esiintyä limakalvomuutoksia, joilla on suurempi riski muuttua pahanlaatuisiksi. Leukoplakia on tasainen tai läiskäinen vaalea suun limakalvolla sijaitseva kudoshuutos, jota ei voida diagnosoida muuksi spesifiseksi muutokseksi. Tupakointi voi aiheuttaa leukoplakiaa. Leukoplakiapotilaista noin

3,5 % sairastuu suusyöpään. Leukoplakian riski muuttua syöväksi riippuu sen histologisesta kuvasta. Leukoplakialle ei ole yhtenäistä hoitokäytäntöä, osa paraneekin itsekseen. Leukoplakiaa voidaan hoitaa myös kirurgisesti. Usein hoito on kuitenkin leukoplakiapotilaan yksilöllinen seuraaminen ja uuden kudoksen otto. (1)

Erythroplakia on suunlimakalvon kirkkaan punainen kudoksenmuutos. Erythroplakia ei parane itsekseen. Erythroplakioista jopa 90 % muuttuu OSCC:ksi ja tämän vuoksi leesio-alue poistetaan aina kokonaan. (1)

Punajäkälä, eli *lichen ruber planus*, on krooninen iho- ja limakalvotauti, jonka etiologia on tuntematon. Suussa punajäkälä aiheuttaa kliinisesti erilaisia muutoksia limakalvoille, usein erilaisia muutoksia esiintyy samanaikaisesti. Vain 1 % punajäkälämuutoksista muuttuu pahanlaatuisiksi. Varsinaisen punajäkälän lisäksi suussa voi esiintyä myös likenoideja eli punajäkälän kaltaisia muutoksia. Punajäkälän ja likenoidin välinen erotusdiagnoosi on usein hankalaa. Likenoideista noin 2,5-3 % kehittyy syöväksi. (1)

Bakteerien merkitys suunsyövän etiologiassa on epäselvä. Suun infektiosairauksissa haitallisten bakteerien määrä suussa on kasvanut. Kariessä bakteerien happamat aineenvaihduntatuotteet aiheuttavat hampaaseen reiän ja parodontiitissa bakteerit ja elimistön puolustusreaktio yhdessä tuhoavat hampaan kiinnityskudosta. Suun bakteerikanta on muuntunut myös suusyövässä, sillä terveen henkilön ja suusyöpäpotilaan suun mikrobiomi on erilainen (3). Terveen suun epiteelissä korostuvat *Streptococci*, *Rothia* ja *Lautropia* suvun bakteerit (3). Suusyöpäpotilaan suussa taas korostuvat *Fusobacterium*-, *Pseudomonas*- ja *Campylobacter*-lajit (3).

Suusyöpäpotilaiden suussa korostuneina esiintyvillä bakteereilla on monia ominaisuuksia, jotka voivat edesauttaa syövän kehittymistä (2). Näitä

mekanismeja ovat apoptoosin inhibitio, solun jakautumisen aktivoituminen, solujen migraation ja invaasion mahdollistaminen, tulehdusreaktion indusoiminen sekä karsinogeenien tuotto (2). *P. gingivalis* kykenee estämään kemiallisesti indusoidun apoptoosin ikenen epiteelisoluissa, stimuloimalla JAK1/STAT3 (*janus kinase 1, signal transducer and activator of transcription*) ja PI3K/Akt (*phosphatidylinositol 3-kinase, protein kinase B*) signalointia (2). *P. gingivalis* aktivoi myös solun jakautumista lisäämällä syklinien määrää, aktivoiden sykliini-riippuvaisia kinaaseja sekä vähentäen p53-proteiinin määrää (7). *P. gingivalis* sekä *F. nucleatum* lisäävät metalloproteiinaasien tuotantoa ikenen epiteelisoluissa, mitkä mahdollistavat solujen migraation ja siten edesauttavat invaasiota (2). *P. gingivalis* lisää ZEB1-proteiinin geeniekspressiota, mikä kontrolloi epiteeli-mesenkyymi-transitiota (8). Epiteeli-mesenkyymi-transitio heikentää ikenen epiteelin suojaavaa vaikutusta, jolloin sen läpäisevyys kasvaa (8). Epiteelin läpäisevyyden kasvu helpottaa syöpäsolujen invaasiota.

*P. gingivalis:n* ja *F. nucleatum:n* on havaittu indusoivan tulehdusreaktiota tuottamalla sytokiineja ja kroonistavan tulehdusta (2). Krooninen tulehdus edesauttaa syövän kehittymiselle otollisen mikroympäristön muodostumista. Suuontelossa monilla *Streptococcus*-suvun bakteereilla on alkoholidehydrogenaasi-entsyymi (ADH) (2). ADH hapettaa alkoholia asetaldehydiksi, joka on karsinogeeni (2).

Suusyöpien ja bakteerien yhteyttä on tutkittu monilla eri menetelmillä erityyppisissä tutkimusasetelmissa. Tutkimukset ovatkin hyvin erilaisia ja täten niiden tuloksia on hankala vertailla keskenään. Seuraavaksi käynkin läpi eri tutkimuksia ja kerään kokoon tietoa käytetyistä tutkimusmenetelmistä. Lisäksi teen käytetyistä tutkimusmenetelmistä yhteenvedon. Tämä mahdollistaa tulosten selkeämmän tarkastelun ja helpottaa niiden vertailukelpoisuuden arviointia.

## 3 Tutkimusmenetelmät

### 3.1 Näytteenotto ja näytteenvalmistus

#### 3.1.1 Ihmisnäytteet

Kun on haluttu tutkia suusyöpäpotilaan suun mikrobiomia, tutkimuksissa esiintyviä näytteenottotapoja ovat olleet biopsia, nk. *swab*-näyte ja sylkinäyte. Biopsia on otettu kirurgisesti kasvaimesta. *Swab*-näyte on pumpulipuikolla tutkittavalta alueelta otettava pyyhkäisynäyte. Kun on otettu sylkinäytettä, potilas on purskutellut steriiliä suolaliuosta ja sylkäissyt näytteen steriiliin purkkiin. (5-7,11-18)

#### 3.1.2 Soluviljelmänäytteet

Soluviljelmissä on tutkittu bakteerien vaikutusta solujen geeniekspressioon. Soluviljelmissä on käytetty ihmisen ikenen epiteelisoluja, ihmisen pään- ja kaulan alueen-solulinjaa (BHY) ja ihmisen OSCC-solulinjoja SCC-25, OSC-20, SAS, BICR-3 ja H-400. Solut on infektoitu bakteereilla, jonka jälkeen syöpää edesauttavien proteiinien geeniekspressiota on tutkittu. Näitä proteiineja ovat olleet muun muassa tulehduksen välittäjäaineet ja epiteeli-mesenkyymi-transitioon liittyvät proteiinit. (4,8,14-16)

#### 3.1.3 Koe-eläinnäytteet

Koe-eläinmallissa eläin on infektoitu tutkittavilla bakteereilla tietyllä konsentraatiolla (*Multiplicity of infection*, MOI) ja väliajoilla. Lopulta eläimet on tapettu ja tapetuista eläimistä on kerätty tutkittavaksi haluttava alue. (9)



### 3.2 Näytteen eristys ja tutkiminen

#### 3.2.1 Deoksiribonukleiinihappoon (DNA) ja ribonukleiinihappoon (RNA) perustuvat menetelmät

DNA:n tai RNA:n eristäminen näytteistä on toteutettu erilaisilla tuotepaketeilla. Biopsioiden DNA:ta tai RNA:ta on eristetty *Gentra Puregene Tissue Kit*:llä (Qiagen), *RNeasy Plus Mini Kit*:llä (Qiagen), *Epicentre Protocol*:llä (Epicentre Biotechnologies) tai *DDK DNA Isolation Kit*:llä (Isohelx) (4,6,10,11). Sylkinäytteiden DNA:ta tai RNA:ta on eristetty *QIAamp DNA Microbiome Kit*:llä (Qiagen), *Qiagen DNA Kit*:llä tai *QIAamp DNA Blood Mini Kit*:llä (Qiagen) (5,12). *Swab*-näytteiden DNA:ta on eristetty *QIAamp DNA Microbiome Mini Kit*:llä (Qiagen) (13). Viljeltyjen solulinjojen DNA:ta tai RNA:ta on eristetty *RNeasy Plus Mini Kit*:llä (Qiagen), *Perfect Pure RNA Kit*:llä (5Prime) tai RT-lyysipuskurilla (Qiagen) sekä spektrofotometrillä (4,8,14,15). Koe-eläinmallin eli hiiren geeniperimää on eristetty *TRIzol*:lla (Invitrogen) (6). Eristetyn DNA:n tai RNA:n määrän ja laadun varmistamiseen on käytetty Nanodrop2000-spektrofotometria (4,8-10,13) (Nanodrop Technologies, Thermofisher). Sentrifugointia on käytetty bakteerien ja solujen erottamiseksi toisistaan. (4,5,16).

Näytteen DNA:ta tai RNA:ta on monistettu polymeraasiketjureaktiolla (PCR). Yleisimmin PCR:ää on käytetty bakteerien lajikohtaisen tunnistuksen mahdollistamiseen, monistamalla bakteerien 16S rRNA:ta geenialueilta V1-V5 (4,8,9,11,14). Myös käänteistranskriptio-PCR:ää on käytetty paljon (4,8,9,14,15). Käänteistranskriptio PCR:ssä RNA käännetään komplementaariseksi DNA:ksi (cDNA) ennen PCR-ajoa. PCR-tuotteiden tarkasteluun ja lajitteluun on käytetty myös agarosigeelielektroforeesia (11,13).

PCR-tuotteet on sekvensoitu käyttämällä sekvensointialustoja, joita ovat olleet *Miseq* (Illumina) ja *Big Dye Terminator* (Thermofisher). Sekvensoinnin jälkeen

valmiita sekvenssejä on haettu eri tietokannoista. Tietokannoissa on tallennettuna bakteerien 16S ribosomaalisen RNA:n (rRNA) V-geenialueiden sekvenssit, joten hakemalla tutkimuksessa saatuja sekvenssejä tietokannasta, on saatu selville näytteessä olleet bakteerit. Käytettyjä hakumenetelmiä ja tietokantoja ovat olleet BLASTN-haku, *GreenGene Gold*-tietokanta, *Human Microbiome Database*-tietokanta (HOMD) ja SILVA rRNA-sekvenssi-tietokanta. (5,6,10-13,17,18)

### 3.2.2 Proteiinien tunnistamiseen perustuvat menetelmät

PCR:n ja sekvensoinnin lisäksi näytteitä on tutkittu immunohistokemiallisesti, jossa näytteet on käsitelty spesifisillä vasta-aineilla. Vasta-aineet tarttuvat tutkittavaan proteiiniin, jolloin proteiinien läsnäolo voidaan todentaa (4,16). Immunohistokemiallisten menetelmien avulla ei kuitenkaan voida saada varmuutta siitä mistä proteiini on näytteeseen päätynyt.

Samankaltaisia vasta-aine tunnistusmenetelmiä ovat ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), *Milliplex Map Human MMP* (Millipore, Billerica) ja *Western Blot* (4,14-16). Myös immunofluoresenssia on käytetty (15). Immunofluoresenssissä vasta-aine tai sekundaari-vasta-aine on fluoresoiva, joka saa aikaan immunoreaktiivisten kohtien kirkkaan värin.

Immunohistokemiallisten analyysien lisäksi on käytetty erilaisia värjäysmenetelmiä. Käytettyjä värjäystekniikoita ovat olleet hematoksyliini-eosiinivärjäys ja Giemsa-värjäys (9,14,16).

## 4 Tutkimukset

### 4.1 Ihmisnäytteet

Tieto mikrobiomin muutoksista kasvaimen yhteydessä on saatu keräämällä potilailta biopsia-, *swab*- ja sylkinäytteitä. Tutkimuksissa kontrolliryhmä on vaihdellut, mikä on otettava huomioon tuloksia tarkasteltaessa ja pohdittaessa niiden merkitystä suusyövässä.

#### 4.1.1 Biopsia-näytteet

Perera:n ja työtovereiden, 2018, tutkimuksessa 25:ltä syysyöpää sairastavalta henkilöltä otettiin biopsia. OSCC sijaitsi limakalvolla tai kielessä. Tutkimuksen verrokkina oli 27 henkilöä, joilla oli fibroepiteelialinen polyyppi (FEP). FEP-potilaiden näytteet otettiin vastaavilta anatomisilta alueilta kuin suusyöpäpotilaiden näytteet. Näytteitä säilöttiin -80°C:ssa käyttöönottoon asti. (6)

DNA eristettiin näytteistä *Gentra Puregene Tissue* kit:llä (Qiagen). 16S rRNA geenin V1 ja V3 alueita monistettiin PCR:llä käyttäen 27FYM ja 519R alukkeita. Geenikirjaston valmistus, indeksointi ja sekvensointi toteutettiin käyttäen *Miseq Reagent Kit* v3:a (2 x 300-bp) (Illumina). (6)

Raakadatan esikäsittelyssä alukkeiden oikeanlaisuus varmistettiin ja sekvenssejä haettiin tietokannasta. Jokainen sekvenssi haettiin BLASTN haulla neljästä eri 16S rRNA tietokannasta, jonka avulla määritettiin sekvenssien paras yhteen osuvuus ja siten lajitasoinen taksonomia. Tämä data syötettiin QIIME:een, jonka avulla määritettiin koko mikrobiomi. (6)

OSCC-potilailla korostuneina bakteerisukuina esiintyivät *Capnocytophaga*, *Pseudomonas* ja *Atopobium*, ja lajitasolla *Campulobacter concicus*, *Prevotella salivae*, *Prevotella loeschii* sekä *Fusobacterium* oraali taksoni. Kontrolleilla korostuivat 7 eri *Streptococcus*-lajia, 2 *Rothia*-lajia, *Lautria mirabilis* ja *Leptotrichia* oraali taksoni. (6)

Pusharlkar:n ja työtovereiden, 2012, tutkimuksessa kymmeneltä OSCC-potilaalta kerättiin kaksi biopsiaa. Yksi näyte otettiin kasvaimesta, jotka sijaisivat kielen- tai suunpohjan alueella. Toinen näyte kerättiin ylähengitysteiden limakalvolta, viiden senttimetrin etäisyydeltä kasvaimesta. Näytteet säilytettiin -80°C:ssa käyttöönottoon asti. (11)

Ensiksi näytteet upotettiin 500 mikrolitraan fosfaatilla puskuroitua suolaliuosta. Seuraavaksi liuokseen lisättiin proteinaasi K:ta, joka pilkkoi näytteen proteiinirakenteet. Bakteerien DNA eristettiin mukaillen *Epicentre*- protokollaa ja puhdistettiin uuttamalla se fenolikloroformissa. Näytteen laatu ja määrä varmistettiin *NanoDrop* ND 1000 (NanoDrop Technologies) spektrofotometrillä. (11)

PCR toteutettiin käyttämällä *nested*-menetelmää. Ensiksi näytteen 16S rRNA monistettiin käyttämällä 8F ja 1492R alukkeita, jonka jälkeen PCR kohdennettiin V4-V5-alueisiin eubakteerialukkeilla prbac1 ja prbac2. (11)

Nested PCR:n tuotteita analysoitiin DGGE:llä (*denaturing gradient gel electrophoresis*). DGGE:ssä käytettiin lajikohtaisia spesifejä DGGE vertailumarkkereita. Elektroforeesiajon valmistuttua elektroforeesigeeli värjättiin etidiumbromidi liuoksella, joka sitoutui nukleiinihappoihin geelillä. PCR-tuotteiden DGGE geelikuvio analysoitiin *Fingerprinting II Informatix* (Bio-Rad) ohjelmalla. Geelit normalisoitiin DGGE standardimarkkereilla. DGGE-analyysin avulla määritettiin dendrogrammi. (11)

DGGE:n lisäksi PCR-tuotteita liitettiin pCR4-TOPO vektoriin ja ne siirrettiin *Escheria coli* TOP10 soluihin käyttämällä TOPO-TA kloonaukittia. Jokaisesta näytteestä valittiin 95-96 näytettä ja yhteensä 1914 näytettä sekvensoitiin. Sekvensointi toteutettiin käyttämällä BigDye Terminator v3.1 ja 806r sekvensointialukkeita. Analysointi suoritettiin yhdistämällä ABI PRISM 3730xl Agencourt CleanSEQ värinpoistoon, jolloin saatiin laadukkaita Sanger-sekvensointi lukuja. Näytteissä olevat bakteerilajit selvitettiin hakemalla 16S rRNA sekvenssejä BLASTN-haulla HOMB-tietokannasta. (11)

Kasvainnäytteissä korostuivat muun muassa bakteerilajit *F. nucleatum*, *Atopobium parvulum*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus salivarius* ja *Gemella haemolysans*. Ei-kasvainnäytteissä taas korostuivat *Parvimonas Migra*, *Streptococcus anginosus* ja *Sptreptococcus mitis*. (11)

Al-Hebshi:n ja työtovereiden, 2017, tutkimukseen osallistui 20 OSCC-potilasta ja 20 verrokkia. OSCC-potilailta otettiin biopsia kasvaimesta ja verrokeilta *swab*-näyte limakalvolta. Kasvaimista otettiin 25 milligramman biopsia, joita säilöttiin -80°C:ssa käyttöönottoon asti. Swab-näytteet otettiin anatomisesti vastaavalta alueelta, joissa kasvaimet sijaitsivat. Swab-näytteet kerättiin steriiliin putkeen ja säilöttiin -20°C:ssa. (10)

Näytteiden DNA-eristettiin DDK *DNA Isolation Kit*:llä (Isohelx). DNA:n määrä ja laatu varmistettiin NanoDrop 2000 spektrofotometrillä (Thermofisher) ja Qubit 2.0 Fluorimeter:llä. PCR:ssä käytettiin 27FYM ja 519R alukkeita, joilla monistettiin 16S rRNA:n V1-V3 alueita. PCR-tuotekirjasto sekvensoitiin käyttäen Miseq Reagent Kit v3:a (2 x 300-bp) (Illumina). (10)

Sekvensointi suoritettiin MiSeq alustalla (Illumina) asetuksilla v3 2 x 300 bp. Raakadata sijoitettiin *Sequence Reads Archive*:n (SRA), jonka jälkeen data käsiteltiin. Data käsiteltiin käyttäen PEAR ohjelmaa, jonka avulla poistettiin

huonolaatuiset tuotteet. Lopullisille tuotteille tehtiin vielä chimera-tarkastus Uchime:lla. (10)

Sekvenssit haettiin yksitellen BLASTN-haulla neljästä eri 16S rRNA-tietokannasta. Hakuun käytettyjä tietokantoja olivat HOMD, chimera-vapaa HOMD, muokattu *Greengene Gold* (modified-GGG) sekä *NCBI's Microbial* 16S. (10)

OSCC-potilaiden ja verrokkiryhmän biopsioiden mikrobiomisto oli erilainen. Sukutasolla OSCC-potilaiden näytteissä korostuivat *Fusobacteria*, *Campylobacter* ja *Pseudomonas* ja lajitasolla *F. nucleatum*, *Pseudomonas aeruginosa* ja *Campylobacter* sp. oraali taxoni 44. (10)

#### 4.1.2 Sylkinäytteet

Yang:n ja työtovereiden, 2018, tutkimukseen osallistui 248 henkilöä, jotka jakaantuivat seuraavasti; 51 tervettä henkilöä, 41 henkilöä joilla 1.tason OSCC, 66 henkilöä joilla 2.tason tai 3.tason OSCC sekä 90 henkilöä joilla 4.tason OSCC. Sylkinäytteiden keräämiseksi potilaat purskuttelivat steriiliä suolaliuosta suussaan 30 sekunnin ajan, jonka jälkeen liuos sylkäistiin steriiliin 50 millilitran purkkiin. Näytteitä sentrifugoitiin 30 minuutin ajan kierrosnopeudella 6000 rpm, jonka jälkeen soluosat säilytettiin -80°C:ssa käyttöönottoon asti. (5)

Bakteeri-DNA:n eristäminen näytteestä suoritettiin *QIAamp DNA Microbiome* Kit:llä (Qiagen). DNA eristäminen tapahtui seuraavasti; yhteen millilitraan eroteltuja soluja lisättiin 500 mikrolitraa AHL puskuria. Isäntäsolujen nukleiinihapot pilkottiin 2,5 mikrolitralla bentsoaasia ja 20 mikrolitralla proteinaasi K:ta. Isäntä-DNA poistettiin sentrifugoimalla. Bakteerisolujen hajottamiseksi näytteeseen lisättiin 200 mikrolitraa ATL puskuria, jonka jälkeen solut käsiteltiin TissueLyser LT:llä 10 minuutin ajan 30 Hz taajuudella. Bakteeri-DNA pestiin

kahdesti, eluoitiin nukleaasi-vapaalla vedellä ja säilöttiin -80°C:ssa käyttöönottoon asti. Puhdistetun DNA:n laatu ja konsentraatio varmistettiin Qubit high-sensitivity dsDNA (Life Technologies) analyysillä. (5)

Näyte-DNA:n 16S rRNA:n V3-V4 monistettiin PCR:llä ja PCR-tuotteet puhdistettiin AMPure XP Beads:llä. Lopulliset tuotteet olivat pituudeltaan noin 630 emäsparia ja ne validoitiin HT DNA *LabChip Kit*:llä (Caliper, PerkinElmer). 16S rRNA sekvensointi toteutettiin MiSeq alustalla (Illumina). Taksonominen määrittäminen suoritettiin GreenGeneGold-tietokannan avulla. (5)

OSCC-potilaiden sylkinäytteissä korostuivat *Fusobacterium periodonticum*, *P. micra*, *Streptococcus constellatus*, *Haemophilus influenza* ja *Filifactor alocis*. Näiden bakteerien suhde kasvoi OSCC tason noustessa. *Fusobacteria*:n osuus kasvoi mitä korkeammalle tasolle OSCC oli kehittynyt. (5)

Hsiao ja työtoverit, 2018, selvittivät eri ryhmiltä kerättyjen sylkinäytteiden mikrobiomin. Tutkittavat henkilöt jaettiin kahteen ryhmään, tutkintaryhmään ja validointiryhmään. Tutkintaryhmään kuului 88 OSCC-potilasta sekä 90 tervettä henkilöä ja tulosten varmistamiseksi (validaatioryhmä) erilliset 50 OSCC-potilasta ja 61 tervettä henkilöä. Kaikilta tutkittavilta kerättiin sylkinäyte Omnigene-ORAL-laitteella (DNA Genotek Inc). Sylkinäytteiden DNA eristettiin QIAGEN DNA:n eristyspakkauksella viikon sisällä näytteen keräämisestä ja säilöttiin -80°C:ssa käyttöönottoon asti. (17)

Suun mikrobiomin selvittämiseksi bakteerien 16S rRNA:n V3-V5 alueita monistettiin PCR:llä käyttäen 341F/926R alukkeita. PCR toteutettiin HiFi PCR Master Mix:ssä (KAPA Biosystems), jolloin tuotteiden pituudeksi saatiin noin 700 emäsparia. Tuotekirjasto puhdistettiin Agencourt AMPure XP Magnetic Beads:llä (Beckman Coulter, Brea) ja konsentraatio mitattiin Qubit dsDNA HS Assay Kit:llä

(Thermo Fisher Scientific). Lisäksi PCR-tuotteet ajettiin elektroforeesissa, jolla varmistettiin 700 emäsparin pituus. (17)

Sekvensointi suoritettiin Miseq alustalla (Illumina). Lähekkäiset sekvenssit jaettiin operatiivisiin taksonomisiin yksikköihin (OTU), ja taksonominen luokittelu toteutettiin Greengenes 16S rRNA tietokannan avulla. OSCC-potilaiden näytteissä korostuivat terveisiin verrokkeihin verrattuna *Prevotella tannerae*, *F. nucleatum* ja *Prevotella intermedia*, kun taas *Streptococcus tigurinus* määrä oli alhainen. (17)

Lee:n ja työtovereiden, 2017, sylkinäyte tutkimukseen osallistui 376 henkilöä, joista 127 oli terveitä, 124:llä oli esiastemuutos ikenen epiteelissä ja 125:llä oli OSCC. Kaikilta kerättiin viiden millilitran sylkinäyte näyteputkiin, jotka säilöttiin -80°C:ssa. (12)

DNA eristettiin suoraan syljestä QIAamp DNA Blood Mini Kit:llä (Qiagen). Jokainen näyte sentrifugoitiin bakteerien erottelemiseksi. Eroteltu bakteerimassa käsiteltiin lysotsyymi-entsyymiliuoksella ja proteinaasi-K-puskurilla. Bakteerien DNA eristettiin QIAamp Spin Column:n (Qiagen) avulla. DNA eluottiin 50 mikrolitralla AE-puskuria. Kaikki näytteet sentrifugioitiin uudelleen ja DNA konsentraatio tarkistettiin NanoPhotometrillä (Implen). Näytteet säilöttiin -80°C:ssa seuraavaan vaiheeseen asti. (12)

DNA monistettiin PCR:llä. DNA monistettiin PCR:llä käyttäen F515 ja R806 alukkeita, joilla tähdättiin 16S rDNA:n V4 alueeseen. PCR-tuotteet ajettiin 2%:ssa agarooosi elektroforeesissa ja värjättiin etidiumbromidilla. Tuotteet puhdistettiin AMPure XP PCR Purification Kit:llä (Agencourt, Beckman Coulter) ja määritettiin Qubit dsDNA HS assay Kit:llä (Life Technologies). V4-kirjaston luomiseksi Illumina adapterit kiinnitettiin PCR-tuotteisiin käyttämällä Illumina TruSeq DNA Sample Preparation v2 Kit:tiä (Illumina). Tämän jälkeen tuotteet sekvensointiin MiSeq alustalla (Illumina). (12)



Valmiita 16S rRNA sekvenssejä vertailtiin SILVA rRNA-sekvenssi tietokantaan, jonka avulla näytteen mikrobiomi saatiin selville. OSCC- ja esiastepotilaiden näytteissä muun muassa seuraavien bakteerisukujen suhde oli kasvanut verrattuna terveeseen verrokkiin: *Bacteroides*, *Escherichia*, *Cloacibacillus*, *Blautia*, *Dorea*, *Faecalibacterium* ja *Phascolarctobacterium*. (12)

#### 4.1.3 Swab-näytteet

Zhao:n ja työtovereiden, 2017, tutkimukseen osallistui OSCC-potilaita sekä terveitä ihmisiä. Molemmilta ryhmiltä otettiin swab-näytteet, OSCC-potilailta syöpäleesioista ja terveiltä anatomisesti vastaavilta alueilta. Näytteet säilöttiin -80°C:ssa käyttöönottoon asti. (13)

DNA eristettiin swab-näytteistä QIAamp DNA Mini Kit:llä (Qiagen). Näytteen määrä ja laatu tarkastettiin NanoDrop ND-1000 spektrofotometrillä (ThermoFisher) ja agaroosigeelielektroforeesilla. DNA näytteet jäädytettiin -20°C:een tulevaa analyysiä varten. (13)

16S rRNA geenisekvensointi suoritettiin MiSeq alustalla (Illumina). Näytteet monistettiin PCR:llä. Alukkeina 515 F ja 926 R, jotka tähtäsivät 16S rRNA:n V4-V5 alueisiin. (13)

Alkuperäiset DNA:n fragmentit liitettiin yhteen FLASH ohjelmalla. Sekvenssit analysoitiin QIIME ohjelmalla. Sekvenssit lajiteltiin OTU:hin 97 prosentin samanlaisuuden tarkkuudella. Jokaisesta OTU:sta valittiin edustava sekvenssi ja niihin lisättiin taksonominen data RDP-lajittelijan (ribosomal database project) avulla. (13) Sekvenssit lajiteltiin taksonomisiin luokkiin HOMD avulla. Bakteerien monimuotoisuus selvitettiin näytteisiin perustuvalla OTU-analyysillä. OSCC-potilaiden näytteissä 6 bakteeripääjakson ja 68 bakteerisukun osuus oli kasvanut

verrattuna verrokkeihin. OSCC-potilaiden näytteissä korostuivat seuraavat pääjaksot: *Spirochates*, *Fusobacteria* ja *Bacteroidetes*, kun taas *Firmicutes* ja *Antinobacteria* osuudet olivat selvästi laskeneet. OSCC-potilaiden näytteissä seuraavien bakteerisukujen osuus oli kasvanut: *Mycoplasma*, *Treponema*, *Campylobacter*, *Eikenella*, *Centipeda*, *Lachnospiraceae\_G\_7*, *Alloprevotella*, *Fusobacterium*, *Selenomonas*, *Dialister*, *Peptostreptococcus*, *Filifactor*, *Peptococcus*, *Catonella*, *Parvimonas*, *Capnocytophaga* ja *Peptostreptococcaceae\_XI\_G\_7*. (13)

Bolz:n ja työtovereiden, 2014, swab-tutkimukseen osallistui 90 henkilöä, joista 30:llä oli OSCC-kasvain, 30 oli suuren riskin potilaita ja 30 tervettä henkilöä. Suuren riskin potilaat olivat runsaasti tupakoivia ja paljon alkoholia käyttäviä henkilöitä, joilla ei ollut OSCC löydöksiä. Kaikilta ryhmiltä kerättiin swab-näytteet. OSCC-potilailta näyte otettiin kasvaimesta ja kun taas toisilta ryhmiltä limakalvoilta. (18)

24 tuntia näytteenoton jälkeen näytteen bakteereja viljeltiin aerobisesti ja anaerobisesti. Solut kasvatettiin Columbia agarissa. Columbia agar sisälsi 5 % lampaan verta, MacConkey agaria, kypsennettyä veri agaria sekä Schaedler agaria. Bakteerien lajitaseeseen tunnistukseen käytettiin VITEK 2 systeemiä ja paneeleita (bioMérieux, RapID, ANA II). Tutkimuksessa selvitettiin myös näytteiden bakteerilajien eroja antibioottiresistenssin suhteen. Antibioottiresistenssierojen tutkimiseksi eri patogeeneja kasvatettiin Mueller-Hinton agarissa tai Mueller-Hinton Fastidious agarissa. Antibioottiresistentti määriteltiin patogeenien kyvyllä diffuntoitua antibioottia sisältävässä agarissa. Bakteerien MIC-arvot (minimal inhibiting concentrations) eri antibiooteille määriteltiin Etest:llä. (18)

Aerobisten ja anaerobisten bakteerien suhde vaihteli ryhmien välillä. OSCC-potilailla anaerobisten bakteerien määrä oli huomattavasti suurempi kuin terveillä verrokeilla.

## 4.2 Soluviljelmänäytteet

Seuraavat tutkimukset toteutettiin soluviljelmän avulla. Soluviljelmissä tutkittiin syövän kehitykseen liittyvien proteiinien ilmentymistä.

Hoppe ja työtoverit, 2016, pyrkivät selvittämään suun patogeenien ja defensiinien suhdetta. Defensiinejä pidetään tärkeänä välittävänä tekijänä kroonisen tulehduksen ja karsinogeneesin välillä. Tutkimus tehtiin terveiden verrokkien, OSCC-potilaiden ja BHY-solujen välillä. BHY-solut ovat luu invasiivisiä suun levyepiteelikarsinooma-soluja. Tutkimukseen osallistui 14 tervettä ja 15 OSCC-potilasta. Terveiltä verrokeilta otettiin kudoksi biopsia ikenestä. OSCC-potilailta poistettiin kirurgisesti pään- tai kaulanalueen kasvain. BHY-soluja kasvatettiin maljalla ja stimuloitiin ihmisen defensiineillä. (4)

RNA eristettiin RNeasy Plus Mini Kit:illä (Qiagen) ja konsentraatio varmistettiin NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies) spektrofotometrillä. RNA monistettiin käänteistranskriptio-PCR:llä (RT-PCR) käyttämällä Superscript III Kit:iä ja oligo(dT)alukkeita (Bio-Rad). (4)

Mikrogramma RNA:ta käänteistranskriptioitiin komplementaariseksi DNA:ksi iScript Select cDNA Synthesis Kit:illä (Bio-Rad). Defensiinien geeniekspression taso analysoitiin reaaliaikaisella PCR:lla käyttäen kullekin defensiinille spesifistä aluketta. (4)

Biopsiat sekä BHY-solut värjättiin immunohistokemiallisesti käyttäen spesifisiä vasta-aineita alfa-defensiineille (HNP-1/3) ja beeta-defensiineille (hBD-1, hBD-2, hBD-3). Ikenen epiteelissä defensiinejä esiintyi vain epiteelin pinnalla, kun taas kasvaimissa ja BHY-soluissa niitä esiintyi kauttaaltaan. Defensiinejä oli pääasiassa sytoplasmassa, mutta niitä oli myös tumassa. (4)

Edellä mainitun lisäksi tutkimusta varten kasvatettiin *P. gingivalis:sta* ja *Aggregatibacter actinomycetemcomitans:sta*. Bakteereja kasvatettiin aivo-sydän uutussa (*brain heart infusion*, BHI). Viljelmiä haudottiin anaerobisessa kammiossa. Bakteerit kerättiin sentrifugoimalla 1500G:llä kymmenen minuutin ajan. Bakteerit laitettiin steriiliin fosfaattipuskuroituun suolaliuokseen (PBS). Bakteerien määrä selvitettiin lukemalla optinen tiheys (650nm). (4)

BHY-solut infektoitiin bakteereilla, jonka jälkeen solujen proteiinit ja tumaproteiinit eristettiin. Proteiinien konsentraatio mitattiin Pierce BCA Protein Assay Kit:llä (ThermoFisher) ja tumaproteiinien määrä analysoitiin Bio-Rad Protein Assay:lla. Western Blot-menetelmän avulla proteiinit eroteltiin kokonsa perusteella ja niiden defensiini-pitoisuus saatiin selville käyttämällä defensiineille spesifejä vasta-aineita. Kaikkien defensiinien, paitsi DEFA4:n, ilmentyminen oli suurempi infektoiduissa soluissa kuin kontrollisoluissa. (4)

Ha ja työtoverit, 2016, pyrkivät tutkimuksessaan selvittämään OSCC:n, interleukiini-8:n (IL-8), matriksin metalloproteinaasien ja bakteerien välistä yhteyttä. Ihmisen OSCC-solulinjoja, SCC-25, OSC-20 ja SAS, kasvatettiin Dulbecco's Modified Eagle's (DME) Medium ja Ham's F-12-elatusliuoksessa (1:1), jossa oli 10 % nautasikiön seerumia (fetal bovine serum, FBS). Kasvatetut solut altistettiin ihmisen rekombinantti IL-8:lle määritettyinä ajankohtina. (14)

Solut infektoitiin *P. gingivalis:lla* tai *Escherichia Coli:lla*, MOI 1:100. Infektioinnin jälkeen solut pestiin PBS:lla ja siirrettiin uudelle antibioottia sisältävälle kasvualustalle. Solut olivat uudella kasvualustalla kunnes ne infektoitiin uudelleen tai kerättiin. Kontrolli OSCC-solut käsiteltiin samoin, mutta niitä ei infektoidu bakteereilla. (14)

Metalloproteinaasien konsentraatiot soluliouksessa mitattiin käyttämällä Milliplex Map Human MMP panel 2 kit:tiä (Millipore, Billerica). Metalloproteinaasit tarttuivat levyihin, jossa oli niiden vasta-ainetta. Metalloproteinaasien konsentraatiot mitattiin Luminex 200 ja BioRad Bio-Plex järjestelmillä. (14)

Soluliuokset kerättiin ja niiden IL-8-pitoisuus mitattiin. Mittaamiseen käytettiin ELISA MAX Deluxe Kit:tiä (Biolegend Inc.), jossa IL-8-spesifinen vasta-aine tarttuu IL-8:aan. Näytteiden IL-8-pitoisuus määritettiin optisen tiheyden avulla (450nm). (14)

Kiinnostavien proteiinien ilmentymistä tutkittiin myös PCR:llä. RNA eristettiin OSCC-soluista RNeasy Mini Kit:n (Qiagen) avulla. RNA:n määrä ja puhtaus varmistettiin MicroQuant Microplate spektrofotometrillä (BioTek Instruments, Winooski). Jokaisesta näytteestä yksi mikrogramma koko näytteen RNA:sta käänteistranskriptioitiin QuantiTect Reverse Transcription Kit:llä (Qiagen). RT-PCR toteutettiin TOPreal SYBR Green PCR Kit:llä (Enzynomics) ABI 7500 Real-Time PCR Detection systeemillä (Applied Biosystems, Carlsbad) käyttäen IL-8:lle sekä GAPDH:lle spesifejä alukkeita. (14)

*P. gingivalis*:lla infektoiduissa OSC-20- ja SAS-solulinjoissa havaittiin suurentunut metalloproteinaasien ilmentyminen. Myös solujen erittämät IL-8 pitoisuudet nousivat 1.5-2.4 kertaisiksi. SCC-25-solulinjasta saadut tulokset eivät olleet yhtä merkittäviä. *E. coli*:lla ei havaittu huomattavia vaikutuksia OSCC-soluissa. (14)

Syöpään liittyvien proteiinien geenien ilmentymisen määrittämisen lisäksi tutkittiin infektoitujen solujen invaasiokykyä. Invaasiokyvyn selvittämiseksi solut asetettiin 96 kuoppaiseen polykarbonaattifiltteriin. Solut olivat yksi prosenttisessa seerumikasvatusliouksessa, jotka oli päällystetty Matrigel:lla (BD biosciences). Alakammiossa oli DME/F12 liuosta, jossa FBS-pitoisuus oli 10 %. 30 tunnin

kuluttua yläkammion solut poistettiin ja alakammioon invasoineet solut visualisoitiin hematoksyliini/eosiini-värjäyksellä. *P. gingivalis* lisäsi selvästi OSC-20- ja SAS-solulinjojen invasiivisuutta. (14)

Sztukowska ja työtoverit, 2016, tutkivat ihmisen ikenen epiteelisoluja ja *P. gingivalis:n* vaikutusta solujen epiteeli-mesenkyyymi-transitioon. Tutkimuksessa tarkasteltiin erityisesti *P. gingivalis:n* vaikutusta ZEB1-proteiinin geeniekspressioon, joka on epiteeli-mesenkyyymi-transitiota säätelevä proteiini.

Tutkimusta varten *P. gingivalis:sta* kasvatettiin tryptikaasi-soija-liemessä (trypticase soy broth, TSB). Liemessä oli myös hiivatiivistettä, hemiiniä ja menadionia. TIGK-solut (human telomerase immortalized keratinocytes) infektoitiin *P. gingivalis:lla* kahdessa ryhmässä, joissa ensimmäisessä ryhmässä MOI oli 50 ja toisessa ryhmässä MOI oli 100. (8)

TIGK-solujen RNA eristettiin ja puhdistettiin PerfectPure RNA Kit:llä (5Prime). Mikro-RNA:n eristykseen ja puhdistukseen käytettiin PureLink miRNA Kit:iä (Invitrogen). Eristetyn RNA:n konsentraatio määritettiin NanoDrop-spektrofotometrillä (NanoDrop Technologies). RNA:sta ja mikro RNA:sta syntetisoitiin komplementaarista DNA:ta High Capacity cDNA käänteistranskriptiokitillä ja TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit:llä. Komplementaarinen DNA monistettiin reaaliaikaisella PCR:llä. (8) Geeniekspressioanalyysillä selvitettiin muun muassa seuraavien proteiinien geeniekspressiot: ZEB1, MMP-9, vimentini, N-kadheriini ja fibronektiini. Näitä proteiineja esiintyy tyypillisesti mesenkyymissä, joten niiden geeniekspression avulla arvioitiin epiteeli-mesenkyyymi-transition astetta. Kaikkien paitsi N-kadheriinin geeniekspressio oli korkeampi infektoitaessa arvolla MOI-100 kuin MOI-50. (8)

Myös Abdulkareem ja työtoverit, 2018, tutkivat parodontiitti patogeenien vaikutusta epiteeli-mesenkyymi-transitioon. OSSC-solulinjoja H400 kasvatettiin ja infektoitiin lämpötapetuilla *P. gingivalis*:lla, *F. nucleatum*:lla tai *E. coli*:lla. Verrokina toimivat solut, joita ei infektoitu. (15)

H400-solulinjan soluja kasvatettiin Dulbecco's Eagle's (DMEM) kasvatusliuoksessa. Liuoksessa oli myös 10 % FBS. Jos solut infektoitiin *P. gingivalis*:lla tai *F. nucleatum*:lla, käytettiin MOI arvoa 100. *E. coli*:lla infektoitaessa konsentraatio oli 20 µg/ml. (15)

Soluviljelmistä otettiin näytteet yhden, viiden ja kahdeksan päivän välein. RNA eristettiin kasvatetuista soluista käyttämällä RT-lyysipuskuria (Qiagen) ja spektrofotometriä (BioPhotometer plus). RNA visualisoitiin agarosigeelillä ja SYBR Gold:lla. Yhdestä mikrogrammasta RNA:ta tehtiin komplementaarista DNA:ta Tetro Kit:illä (Bioline) tai RT2 Strand Kit:illä (Qiagen). Ennen PCR-analyysiä, näytteet yhdistettiin RT2 SYBER Green Mastermix:n (Qiagen). (15)

Komplementaarista DNA:ta monistettiin semikvantitatiivisella RT-PCR:llä (sq-RT-PCR). PCR-tuotteet visualisoitiin agarosigeelillä ja etidiumbromidilla. Data kerättiin LightCycler 480:lla ja analysoitiin Qiagen Online työkalulla. (15)

Sq-RT-PCR-analyysin avulla tutkittiin epiteeli-mesenkyymi-transitio markkeriproteiinien ilmentymistä. Analyysi osoitti E-kadheriini-, vimentiini-, Twist- ja Snail-ilmentymisen kasvun soluviljelmissä.

Epiteeli-mesenkyymi-transitio markkeriproteiinien ilmentymisen tutkimisen lisäksi mitattiin tulehduksen välittäjäaineiden ilmentymistä. Proteiinien ilmentymisen mittaamiseen käytettiin ELISA Kit:ä (R&D Systems). TGF-beeta1-, TNF-alfa- ja EGF-pitoisuudet soluviljelmissä kasvoivat infektiokertojen myötä. (15)

Grimm ja työtoverit, 2014, selvittivät OSCC:n, *Helicobacter pylori*:n ja TLR5:n (toll like receptor) yhteyttä. Tutkimukseen osallistui 191 OSCC potilasta ja 10 tervettä verrokkia. Kasvaimet kerättiin parafiiniin upotetusta kudoksesta. Kasvaimista leikattiin 2 mikrometrin paksuisia ohutleikkeitä. (16)

*H. pylori*:n ja TLR5:n ilmentyminen näytteissä selvitettiin formaliinilla fiksatuista, parafiiniin pedatuista kudoksista immunohistokemiallisesti ja käyttämällä Giemsa-värjäystä. Immunohistokemiallisessa analyysissä käytettiin ei-konjugoitunutta *H. pylori*:a, TLR5- ja isotooppi kontrolli vasta-aineita. (16)

Immunohistokemiallinen osoitti että *H. pylori*:a tai TLR5:ttä ei esiintynyt verrokkien näytteissä. *H. pylori*:a esiintyi noin 38 potilaan kasvainleikkeessä. *H. pylori* positiivissa näytteissä ei havaittu TLR5 ilmentymisen kasvua tai se oli hyvin pientä. (16)

Immunohistokemiallisen analyysin lisäksi TLR5 ilmentymistä tutkittiin OSCC-solulinjoissa (BICR3 ja BICR56) Western Blot-menetelmällä. Soluja kasvatettiin DMEM/F-12 kasvatusliemessä, mikä sisälsi 10 % FBS, 1 % fungisiidia ja penisilliiniä/streptomysiiniä. Kasvatuksen jälkeen soluliuos kerättiin ja sentrifugoitiin. Erotellut solut hajotettiin puskuriliuoksella, joka sisälsi proteolyyttisiä entsyymejä. Puskuri käsittelyn jälkeen 100 mikrogrammaa hajotettua solumassaa eroteltiin 10 % SDS-PAGE elektroforeesilla ja siirrettiin nitroselluloosa kalvolle. Kalvot analysoitiin immunoblottauksella, jossa käytettiin TLR5- ja GAPDH spesifejä vasta-aineita. Primaaristen vasta-aineiden kiinnittyminen havaittiin sekundaarisella HRP-konjugaatti vasta-aineella ja visualisoitiin kemiluminesenssillä. TLR5-vasta-aineiden sitoutumisvoimakkuus Western Blot-levyistä määritettiin densitometrisellä analyysillä. TLR5-ilmentyminen ei ollut suurentunut OSCC-soluissa verrokkiin verrattuna. (16)



### 4.3 Koe-eläinnäytteet

Binder Gallimidi ja työtoverit, 2015, tutkivat OSCC:n ja parodontiitti bakteerien välistä yhteyttä koe-eläinmallissa. Tutkittavia bakteereita olivat *P. gingivalis* ja *F. nucleatum*. (9)

Ensimmäisessä kokeessa suoritettiin *in vivo* karsinogeneesi hiirillä. 10-12 viikkoa vanhat hiiret jaettiin kahteen ryhmään, 7 hiirtä ryhmää kohden. Toisen ryhmän hiiriä infektoidiin 3 kertaa viikossa kahden viikon ajan *P. gingivalis*:lla ja *F. nucleatum*:lla. Tämän jälkeen hiirten juomaveteen lisättiin kahdeksan viikon ajan 50 ppm 4-nitrokinoliini-1-oksidia (4 NQO), joka on voimakas karsinogeeni. 4 NQO:ta lisättiin myös kontrolliryhmän hiirten juomaveteen. Infektoidujen hiirien infektoimista jatkettiin vielä kahdeksan viikon ajan kahdesti viikossa. Tämän jälkeen molempien ryhmien hiiret tapettiin ja niiden kielet kerättiin. (9)

Kielet käsiteltiin 4 % paraformaldehydillä, pedattiin parafiiniin ja leikattiin 5 mikrometrin paksuisiksi ohutleikkeiksi. Osa leikkeistä värjättiin hematoksyliini/eosiini-värjäyksellä. Patologi arvioi valmiit näytteet asteikolla 0-3. Asteikko määriteltiin seuraavasti, 0 = ei invaasiota, 1 = maligneja soluja tyvisolukerrokseen, mutta ei invaasiota lihassolukerrokseen, 2 = pientä invaasiota myös lihassolukerrokseen, 3 = invaasio kauttaaltaan lihassolukerrokseen. Patologi arvioi näytteet tietämättä kummasta hiiriryhmästä näyte oli otettu. (9) Infektoiduneiden hiirien kasvaimet olivat 2,5 kertaa suurempia kuin verrokkiryhmän ja ne olivat myös paljon invasiivisempia. (9)

Seuraavaksi jäljellä olevista leikkeistä valittiin verrokkiryhmän ja infektioryhmän näytteitä. Näytteiksi valittiin leikkeitä, jotka joko sisälsivät tai eivät sisältäneet syöpää. Näytteet värjättiin immunovärjäyksellä käyttäen sykliini D1 vasta-ainetta. Sykliini D1:n läsnäolo on oleellista, koska se on merkittävä onkogeeni

kokeellisessa tuumorigeneesissä. Värjäyksen avulla nähtiin eri sykliinien suurentunut määrä infektoidujen hiirien näytteissä. (9)

Toisessa kokeessa hiiriä infektoitiin *P. gingivalis:lla* ja *F. nucleatum:lla* joka toinen päivä kuuden päivän ajan. 24 tuntia viimeisen infektion jälkeen hiiret tapettiin ja niiden kielet kerättiin. Kielet värjättiin immunovärjäyksellä käyttäen pSTAT3 vasta-ainetta. Immunovärjäys osoitti pSTAT-positiivisten solujen suurentuneen määrän infektoiduissa näytteissä. (9)

Kolmannessa kokeessa hiiriä infektoitiin *P. gingivalis:lla* ja *F. nucleatum:lla* joka toinen päivä kuuden päivän ajan. Hiiret tapettiin neljä tuntia viimeisen infektion jälkeen, kielet kerättiin ja niistä valmistettiin jääleikkeet. Jääleikkeistä kerättiin kielen limakalvo ja RNA eristettiin TRIzol:lla (*Invitrogen*). Määrä varmistettiin spektrofotometrillä. 1 mikrogramma RNA:ta käänteistranskriptoitui ja siitä saatu komplementaarinen DNA monistettiin s-RT-PCR:llä. PCR-analyysi suoritettiin Automated Rotor Gene System RG-3000A:lla (Corbett research). Analyysin mukaan infektoiduneiden hiirien näytteiden interleukiini-6-lähetäjä-RNA konsentraatio oli kolminkertainen verrokkiryhmään verrattuna. (9)

## 5 Yhteenvetotaulukko tutkimusten menetelmistä, päälöydöksistä ja tutkituista bakteereista

MENETELMÄT	NÄYTE	BAKTEERIT	PÄÄLÖYDÖS
Gentra Puregene Kit (Qiagen) PCR 16S rRNA V1 & V3 MiSeq (Illumina) BLASTN QIIME (6)	Biopsia	<i>Porphyromas gingivalis</i> <i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Campylobacter concicus</i> <i>Prevotella salivae</i> <i>Prevotella loeschii</i>	OSCC-potilailla <i>Campylobacter concicus</i> :n, <i>Prevotella salivae</i> :n ja <i>Prevotella loeschii</i> :n sekä <i>Fusobacterium</i> oraali taksonin esiintyvyys oli suurentunut kontrolliin verrattuna.
Epicentre Protocol (Epicentre Biotechnologies) PCR 16S rRNA V4 & V5 Elektroforeesi Big Dye Terminator (ThermoFisher) BLASTN HOMD (11)	Biopsia	<i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Atopobium parvulum</i> <i>Streptococcus gordonii</i> <i>Streptococcus salivarius</i> <i>Gemella haemolysans</i>	Kasvainnäytteissä korostuivat <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Atopobium parvulum</i> , <i>Streptococcus gordonii</i> , <i>Streptococcus salivarius</i> ja <i>Gemella haemolysans</i> .
DDK DNA Isolation Kit (Isohelx) PCR 16S rRNA V1-V3 MiSeq (Illumina) BLASTN HOMD Trusted-HOMDext Greengene Gold NCBI Microbial 16S (10)	Biopsia	<i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Campylobacter sp. oraali taxoni 44</i>	OSCC-potilaiden näytteissä korostuivat <i>Fusobacterium nucleatum</i> ja <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sekä <i>Campylobacter sp. oraali taxoni 44</i> .
QIAamp DNA Microbiome Kit (Qiagen) PCR 16S rRNA V3 & V4 MiSeq (Illumina) (5)	Sylki	<i>Fusobacterium periodonticum</i> <i>Parvimonas micra</i> <i>Streptococcus constellatus</i> <i>Haemophilus influenza</i> <i>Filifactor alocis</i>	Mitä suuremmalle tasolle OSCC oli edennyt sitä suurempi oli <i>Fusobacterium periodonticum</i> :n, <i>Parvimonas micra</i> :n, <i>Streptococcus constellatus</i> :n, <i>Haemophilus influenza</i> :n ja <i>Filifactor alocis</i> :n esiintyvyys näytteissä.
Qiagen DNA Kit PCR 16S rRNA V3-V5 MiSeq (Illumina) Greengenes (17)	Sylki	<i>Prevotella tanneriae</i> <i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Prevotella intermedia</i>	<i>Prevotella tanneriae</i> :n, <i>Fusobacterium nucleatum</i> :n ja <i>Prevotella intermedia</i> :n esiintyvyys oli suurentunut OSCC-potilaiden näytteissä.

MENETELMÄT	NÄYTE	BAKTEERIT	LÖYDÖS
QIAamp DNA Blood Kit (Qiagen) PCR 16S rRNA V4 MiSeq (Illumina) SILVA (12)	Sylki	<i>Bacteroides</i> <i>Escherichia</i> <i>Cloacibacillus</i> <i>Blautia</i> <i>Dorea</i>	<i>Bacteroides</i> -, <i>Escherichia</i> -, <i>Cloacibacillus</i> -, <i>Blautia</i> - ja <i>Dorea</i> bakteerisukujen määrä oli suurentunut OSCC-potilaiden ja esiastepotilaiden näytteissä.
QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) MiSeq V4 & V5 (Illumina) QIIME HOMD (13)	Swab	<i>Mycoplasma</i> <i>Treponema</i> <i>Campylobacter</i> <i>Eikenella</i> <i>Centipeda</i> <i>Lachnospiraceae_G_7</i> <i>Alloprevotella</i> <i>Fusobacterium</i> <i>Selenomonas</i> <i>Dialister</i> <i>Peptostreptococcus</i> <i>Filifactor</i> <i>Peptococcus</i> <i>Catonella</i> <i>Parvimonas</i> <i>Capnocytophaga</i> <i>Peptostreptococcaceae_XI_G_7</i>	Erityisesti <i>Spirochates</i> -, <i>Fusobacteria</i> - ja <i>Bacteroidetes</i> pääjaksojen bakteerit korostuivat OSCC-potilaiden näytteissä.
RNAeasy Plus Mini Kit (Qiagen) RT-PCR SYBR-GREEN (ThermoFisher) Pierce BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher) Bio-Rad Protein Assay (4)	Soluviljelmä BHY-solu	<i>Porphyromonas gingivalis</i> <i>Aggregatibacter</i> <i>actinomycetemcomitans</i>	Kaikkien tutkittujen defensiinien määrä, paitsi DEFA4:n, määrä oli kasvanut bakteereilla infektoiduissa soluissa.
ELISA MAX Deluxe Kit (Biolegend Inc.) RNeasy Mini Kit (Qiagen) Quantitect Reverse Transcription Kit (Qiagen) TOPreal SYBR Green PCR Kit (Enzynomics) Hematoksyliini/eosiini-värijäys (14)	Soluviljelmä SCC-25 OSC-20 SAS	<i>Porphyromonas gingivalis</i> <i>Escherichia coli</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i> :lla infektoiduissa soluissa havaittiin metalloproteinaasien ja IL-8 erityksen kasvu sekä solujen invaasiokyvyn nousu.

MENETELMÄT	NÄYTE	BAKTEERIT	LÖYDÖS
Perfect Pure RNA (5Prime) Capacity cDNA & TagMan Micro RNA Reverse Transcription Kit TagMan Fast Universal PCR (8)	Soluviljemä TIGK-solu	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Epiteeli-mesenkyymi-transitioon liittyvien proteiinien geeniekspressio kasvoi <i>Porphyromonas gingivalis</i> :lla infektoiduissa soluissa.
RT-lyysipuskuri (Qiagen) Spektrofotometri DNA Tetra Kit (Bioline) RT2 Strand Kit (Qiagen) Sq-RT-PCR ELISA Kit (R&D Systems) (15)	Soluviljemä H400	<i>Porphyromonas gingivalis</i> <i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Escherichia coli</i>	Sekä epiteeli-mesenkyymi-transitioon liittyvien proteiinien että tulehduksen välittäjäaineiden ilmentyminen oli lisääntynyt mitä useammin soluja infektotiin.
Immunohistokemia Giemsa-värijäys Western Blot Immunoblottaus Elektroforeesi (16)	Kasvainleike Soluviljemä BICR3	<i>Helicobacter pylori</i>	<i>H. Pylori</i> :a esiintyi kasvainleikkeissä, mutta immunohistokemialliset tulokset eivät osoittaneet läsnäololla olevan merkitystä OSCC kanssa. OSCC-soluissa ei havaittu suurentunutta TLR5-pitoisuutta verrokkiin verrattuna.
Hematoksyliini/eosiinivärijäys Immunohistokemia q-RT-PCR (9)	Hiiri	<i>Porphyromonas gingivalis</i> <i>Fusobacterium nucleatum</i>	Infektoidujen hiirien kasvaimet olivat suurempia ja ne olivat invasiivisempia. Sykliini D1, pSTAT3 ja interleukiini-6-lähetäjä-RNA määrä oli kasvanut kasvainleikkeissä.

## 6 Pohdinta

Tutkimukset osoittavat bakteerien ja niiden dysbioosin liittyvän OSCC kehittymiseen. Tutkimustulosten perusteella bakteereilla näyttää olevan vaikutusta syöpää edesauttavien prosessien syntyyn. Bakteerien läsnäolo näyttää vaikuttavan erityisesti kudoksen välittäjäaineiden ilmentymiseen sekä epiteeli-mesenkyymi-transitioon (4,8,14,15). Tutkimuksissa havaitaan myös bakteerien liittyvän syövän läsnäoloon, kehitymisasteeseen ja invaasiokykyyn (5,6,9,10-13,17).

*F. nucleatum* nousee esille useissa tutkimuksissa (5,6,10,11,13,15,17). *F. nucleatum*:n määrä OSCC-potilaan biopsioissa on kohonnut verrattuna terveeseen verrokkiin (6,10,11). Myös OSCC-potilaiden sylkinäytteissä todetaan *Fusobacterium*-lajien ja *F. nucleatum*in suurentunut määrä verrattaessa syöpää sairastamattoman henkilön sylkinäytteessä esiintyviin bakteereihin (5,17). Sylkinäytteissä havaitaan myös *F. periodonticum*:n määrän kasvavan mitä pidemmälle syöpä on kehittynyt (5). *F. nucleatum* korostuu myös swab-näytteissä, kun verrataan OSCC-potilaiden syöpäleesioista ja verrokkien anatomisesti vastaavilta alueilta otettujen näytteiden löydöksiä (13). Soluviljelmätutkimuksissa havaitaan epiteeli-mesenkyymi-transitioon liittyvien proteiinien ja tulehduksen välittäjäaineiden lisääntyminen *F. nucleatum* infektoinnin seurauksena (15). Hiirillä toteutetuissa eläinkokeissa havaitaan *F. nucleatum* infektion seurauksena suurempia ja invasiivisempia kasvaimia (9).

Toinen tutkimuksissa usein esiintyvä bakteeri on *P. gingivalis*. Tutkimuksissa havaitaan *P. gingivalis*:n kasvattavan epiteeli-mesenkyymi-transitioon liittyvien proteiinien, tulehduksen välittäjäaineiden, metalloproteiinaasien ja IL-8:n määrää soluviljelmissä (8,14,15). *P. gingivalis* näyttää myös lisäävän solujen invaasiokykyä (14). *P. gingivalis*:lla infektointi aiheuttaa hiirillä suurentuneita ja invasiivisempia kasvaimia (9).

Tutkittaessa suusyövän ja bakteerien välistä yhteyttä, käytetyillä tutkimusmenetelmillä on suuri vaikutus tutkimustulosten luotettavuuteen. Erilaiset PCR-tekniikat ovat paljon käytetty menetelmä tutkimuksissa. PCR:llä kudoksen proteiineja tutkittaessa ei voida kuitenkaan tietää onko tutkittava bakteeri edelleen kudoksessa vai onko kudoksessa vain geneettisiä jäämiä siellä joskus olleesta bakteerista.

Immunohistokemialliset menetelmät ovat luotettava keino osoittamaan tutkittavan proteiinin läsnäolo näytteessä. Immunohistokemiallisia tekniikoita käytettäessä ei kuitenkaan voida määrittää onko bakteeri oikeasti kudoksessa vai onko bakteerin tuottama proteiini päätenyt näytekudokseen muista kudoksista.

Tutkittaessa *in situ* bakteerin läsnäolo voidaan osoittaa DNA tutkimusmenetelmillä, joiden ansiosta bakteerin muoto on nähtävissä kudoksessa. Tämänkaltaisten menetelmien käyttö mahdollistaa bakteerin läsnäolon osoittamisen näytteessä tutkimushetkellä. Käytettävien tutkimusmenetelmien kehittäminen ja siitä seuraava tutkimustulosten yksiselitteisyyden avulla kausaliteetin määrittäminen olisi helpompaa.

Tutkimusten toteuttaminen eläinmallissa on yleisesti käytetty menetelmä. Eläinmallin avulla voidaan tutkia ja osoittaa asioita, joita ihmisellä ei eettisistä syistä voi toteuttaa. Tulosten luotettavuutta heikentää kuitenkin eläinmallin ja ihmisen erilaisuus. Esimerkiksi hiiri on paljon käytetty laji eläintutkimuksissa. Ihminen ja hiiri lajeina ovat kuitenkin monilta osin erilaisia. Eroavaisuuksia on myös suun mikrobiomiston osalta, joten selvän syyseuraussuhteen määrittäminen eläinmalliin perustuen ei ole täysin luotettava menetelmä.

Useat tutkimuksissa esiintyvät syövän kehitykseen liittyvät bakteerit ovat myös parodontiitin patogeeneja. Parodontiitin mahdollinen yhteys suusyöpään olisi tärkeä määrittää, parodontiitin ollessa maailmanlaajuinen terveysongelma.

Parodontiitti on merkittävä kansanterveydellinen ongelma myös Suomessa (20). 64 %:lla 30-vuotta täyttäneistä suomalaisista esiintyy vähintään yksi syventynyt ientasku ( $\geq 4$  mm) (20).

Parodontiitti on useimmiten ehkäistävissä suun tehokkaalla omahoidolla. Hampaansa vähintään 2 kertaa päivässä harjaavilla esiintyy vähemmän parodontiittia kuin hampaansa harvemmin harjaavilla (20). Ihmisten motivoiminen hampaiden omahoitoon on tärkeää. On tärkeää kertoa parodontiitin kroonisesta luonteesta ja sen negatiivisista vaikutuksista koko elimistön terveyteen. Parodontiittia sairastavilla on ilmeisesti suurentunut riski sydän- ja verisuonisairauksiin (20). Parodontiitin tiedetään myös huonontavan diabeteksen hoitotasapainoa ja lisäävän diabeteskomplikaatioiden riskiä (20). Parodontiitin ja suusyövän yhteyden määrittäminen olisikin seuraava tärkeä hammaslääketieteellinen saavutus.

Bakteerien ja suusyövän kausaliteetin määrittäminen olisi erittäin tärkeää suusyövän ehkäisyyn, diagnoosiin ja hoidon kannalta. Varsinkin suusyövän ehkäisyyn ja varhaiseen diagnoosiin pitäisi panostaa, sillä suusyöpä on aggressiivinen ja nopeasti etenevä tauti. (1). Jos kausaliteetti saataisiin määritettyä, myös suun perustutkimuksessa tehtävä parodontologinen status voisi antaa enemmän informaatiota potilaan mahdollisesta suusyöpäriskistä.

Kausaliteetin määrittämiseksi olisikin tärkeää tehdä yhteistyötä eri tutkimusmalleja ja näytteitä hyödyntävien sairaanhoito- ja tutkimusyksiköiden välillä ja löytää keinoja joiden avulla saataisiin luotettavia tutkimustuloksia ja tietoa mahdollisesta kausaliteetista.



## Lähdeluettelo

- (1) Suusyöpä. Käypä hoito-suositus. Suomalaisen Lääkäriseuran Duodecimin ja Suomen Hammaslääkäriseura Apollonian asettama työryhmä. Helsinki: Suomalainen Lääkäriseura Duodecim, 2019 (viitattu 10.02.2020). Saatavilla internetissä: [www.kaypahoito.fi](http://www.kaypahoito.fi)
  
- (2) Perera M, Al-Hebshi NN, Speicher DJ, Perera I, Johnson NW. Emerging role of bacteria in oral carcinogenesis: a review with special reference to periopathogenic bacteria. *J Oral Microbiol* 2016;8:32762.
  
- (3) Healy CM, Moran GP. The microbiome and oral cancer: More questions than answers. *Oral Oncol* 2019 Feb;89:30-33.
  
- (4) Hoppe T, Kraus D, Novak N, Probstmeier R, Frentzen M, Wenghoefer M, et al. Oral pathogens change proliferation properties of oral tumor cells by affecting gene expression of human defensins. *Tumour Biol* 2016 Oct;37(10):13789-13798.
  
- (5) Yang CY, Yeh YM, Yu HY, Chin CY, Hsu CW, Liu H, et al. Oral Microbiota Community Dynamics Associated With Oral Squamous Cell Carcinoma Staging. *Front Microbiol* 2018 May 03;9:862.
  
- (6) Perera M, Al-Hebshi NN, Perera I, Ipe D, Ulett GC, Speicher DJ, et al. Inflammatory Bacteriome and Oral Squamous Cell Carcinoma. *J Dent Res* 2018 June 01;97(6):725-732.
  
- (7) Nieminen MT, Listyarifah D, Hagström J, Haglund C, Grenier D, Nordström D, et al. *Treponema denticola* chymotrypsin-like proteinase may contribute to orodigestive carcinogenesis through immunomodulation. *Br J Cancer* 2018 02 06;118(3):428-434.
  
- (8) Sztukowska MN, Ojo A, Ahmed S, Carenbauer AL, Wang Q, Shumway B, et al. *Porphyromonas gingivalis* initiates a mesenchymal-like transition through ZEB1 in gingival epithelial cells. *Cell Microbiol* 2016 06;18(6):844-858.
  
- (9) Binder Gallimidi A, Fischman S, Revach B, Bulvik R, Maliutina A, Rubinstein AM, et al. Periodontal pathogens *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* promote tumor progression in an oral-specific chemical carcinogenesis model. *Oncotarget* 2015 Sep 08;6(26):22613-22623.

- (10) Al-Hebshi NN, Nasher AT, Maryoud MY, Homeida HE, Chen T, Idris AM, et al. Inflammatory bacteriome featuring *Fusobacterium nucleatum* and *Pseudomonas aeruginosa* identified in association with oral squamous cell carcinoma. *Sci Rep* 2017 05 12;;7(1):1834.
- (11) Pushalkar S, Ji X, Li Y, Estilo C, Yegnanarayana R, Singh B, et al. Comparison of oral microbiota in tumor and non-tumor tissues of patients with oral squamous cell carcinoma. *BMC Microbiol* 2012 July 20;12:144.
- (12) Lee W, Chen H, Yang S, Liang C, Peng C, Lin F, et al. Bacterial alterations in salivary microbiota and their association in oral cancer. *Sci Rep* 2017 Nov 28;;7(1):16540.
- (13) Zhao H, Chu M, Huang Z, Yang X, Ran S, Hu B, et al. Variations in oral microbiota associated with oral cancer. *Sci Rep* 2017 09 18;;7(1):11773.
- (14) Ha NH, Park DG, Woo BH, Kim DJ, Choi JI, Park BS, et al. *Porphyromonas gingivalis* increases the invasiveness of oral cancer cells by upregulating IL-8 and MMPs. *Cytokine* 2016 10;86:64-72.
- (15) Abdulkareem AA, Shelton RM, Landini G, Cooper PR, Milward MR. Periodontal pathogens promote epithelial-mesenchymal transition in oral squamous carcinoma cells in vitro. *Cell Adh Migr* 2018 03 04;;12(2):127-137.
- (16) Grimm M, Munz A, Exarchou A, Polligkeit J, Reinert S. Immunohistochemical detection of *Helicobacter pylori* without association of TLR5 expression in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2014 Jan;43(1):35-44.
- (17) Hsiao J, Chang C, Lee W, Huang C, Ou C, Tsai S, et al. The interplay between oral microbiome, lifestyle factors and genetic polymorphisms in the risk of oral squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis* 2018 05 28;;39(6):778-787.
- (18) Bolz J, Dosá E, Schubert J, Eckert AW. Bacterial colonization of microbial biofilms in oral squamous cell carcinoma. *Clin Oral Invest* 2014;18(2):409-414.
- (19) Parodontiitti. Käypä hoito-suositus. Suomalaisen Lääkäriseuran Duodecimin ja Suomen Hammaslääkäriseura Apollonia ry:n asettama työryhmä. Helsinki: Suomalainen Lääkäriseura Duodecim, 2019 (viitattu 31.05.2020). Saatavilla internetissä: [www.kaypahoito.fi](http://www.kaypahoito.fi)